腐霉菌 *Pythium splendens* 引起之馬拉巴栗苗木病害

安寶貞[1,5] 陳麗鈴[2] 蘇俊峯[1] 楊正偉[1] 蔡惠玲[1] 蔡幸君[3] 蔡志濃[1] 謝廷芳[4]

1. 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組。台中霧峰。
2. 國立屏東科技大學植物醫學系。屏東內埔。
3. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局台中分局嘉義檢疫站。嘉義市。
4. 行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心。雲林古坑。
5. 聯絡作者，電子郵件信箱：pjann5039@gmail.com；傳真機：04-23302308。

接受日期：中華民國 103 年 7 月 21 日

摘　要

安寶貞、陳麗鈴、蘇俊峯、楊正偉、蔡惠玲、蔡幸君、蔡志濃、謝廷芳。2014。腐霉菌 *Pythium splendens* 引起之馬拉巴栗苗木病害。植病會刊 23: 285-292

自 2011 至 2013 年，經由田間、編辮場及集貨場調查，腐霉菌主要為害馬拉巴栗 (*Pachira macrocarpa*) 的編辮苗及集貨場貨品，造成苗木失編與外銷貨品腐敗。腐霉病菌經由切根傷口入侵，造成根部與莖基部組織褐化腐敗，導致部分或全部編辮苗的死亡，在降雨季節，發病率可達 30-50%，甚而更高。此外，病菌可為害苗圃幼苗根系，在發病初期，植株地上部病徵不明顯，嚴重時下位葉黃化落葉繼而死亡，而地下部罹病主根則凹陷、縊縮，且罹病組織褐化腐敗。目前自苗圃、編辮場及集貨場等 26 個場地檢測得腐霉菌，共分離得腐霉菌 26 株，均鑑定為 *Pythium splendens*。該菌不產生孢囊，只形成球狀厚膜孢子。單株培養不形成有性世代，為異絲型，藏卵器球形或近似球形，每個藏卵器可被 1-3 個藏經器附著。在 8-35℃下皆可生長，最適生長溫度為 28℃。接種結果顯示，腐霉菌不易侵入健康苗木組織，但可由傷口入侵，在 24-28℃下發病嚴重，為造成編辮苗失編的主要原因之一。本文為世界首度報導證實 *P. splendens* 可為害馬拉巴栗。

關鍵詞：馬拉巴栗、腐霉根腐病、*Pythium splendens*。

前　言

馬拉巴栗〔malabar chestnut, *Pachira macrocarpa*（Cham. et Schl.）Schl. et L. H. Bailey〕屬木棉科馬拉巴栗屬植物，為常綠或半落葉喬木，原產於中南美洲。其用途廣泛，種子可食用，主要用途在於觀葉[10]。在台灣，馬拉巴栗主要分布於彰化與屏東兩地，以彰化溪州栽培最多；產業以外銷苗木為主，輸往中國大陸、日本、韓國、歐美各地[10]。觀葉馬拉巴栗苗木的生產流程較為繁瑣，共分 5 個環節，包括播種、育苗、編苗、定植及採後處理[13]。但自 2009 年起，馬拉巴栗外銷貨品在出貨前即發生嚴重根腐情形，篩選過後的苗木在到達進口國時腐敗率更高，尤其是白露前後（國曆 9 月上旬）出貨的貨品，其根部腐敗率高達 60-70%以上，嚴重影響農民收益與我國商譽。

在台灣，有關馬拉巴栗病害的研究報導甚少，台灣植物病害名彙有記載的馬拉巴栗病害包括褐根病〔*Phellinus noxius*（Corner）G. H. Cunningham 引起〕、根腐病〔*Phytophthora cinnamomi* Rands, *P. Palmivora*（Butler）Butler 引起〕及疫病〔*P. citrophthora*（R. E. Smith & E. H. Smith）Lionian 引起〕[8]。在吾人初步分離接種試驗中，發現有多種卵球菌與真菌均可造成馬拉巴栗幼苗根腐、死亡與編辮苗腐敗、失編，其中又以 *Phytophthora* spp.、*Pythium splendens* Braun 及 *Lasiodiplodia theobromae*（Pat.）Griff. & Maubl.較為頻繁[1,2,4]，其中 *P. splendens* 會引起苗木根腐、編辮苗根腐及出口貨品根腐，對產業影響甚大。本研究將報告腐霉菌對馬拉巴栗苗木之危害情形，另兩種病原菌引起的病害業已另文發表[5,6,11]。本文並為腐霉菌誘發馬拉巴栗病害的首度報導。

材料與方法

田間病害調查與病菌分離、保存

不定期前往彰化縣溪州鄉、二水鎮、田中鎮與雲林縣土庫鎮與虎尾鎮等馬拉巴栗主產區，調查不同栽培期馬拉巴栗病害發生情形，包括苗期、編苗期（編辮場）、本田期及出貨貨品（集貨場）。將罹病植株攜回實驗室，先以自來水洗淨罹病根部與莖部組織，將其切成 10 mm 長小片段，以 0.5%（v/v）次氯酸鈉（NaClO）水溶液進行表面消毒 30 sec，經乾淨舒潔衛生紙吸乾組織表面的水份，將一半的罹病組織移置於含有 20 mL 的馬鈴薯葡

萄糖瓊脂（potato dextrose agar，簡稱 PDA）之培養皿（直徑 9 cm）內，以分離可疑病原菌。另一半的罹病組織則置於分離卵球菌之 5% Clarified V-8 juice agar（5% CVA）半選擇性培養基[9]上。半選擇性培養基的製作為先配製 5% CVA〔將 5% V-8 vegetable juice（Campbell, New Jersey, USA）與 0.2% $CaCO_3$ 混合後，經 1,500 rpm 低速離心 5 min，取上層液，再加入 2% Bacto agar〕，於滅菌後加入 ampicillin 100 ppm、PCNB（pentachloronitrobenzene）10 ppm 及 mycostatin 50 ppm。罹病組織於室溫培養（25-28℃）1-2 天後即會有菌絲生長出，切取菌絲前端移置於 5% V-8 vegetable juice agar（5% VA，將 5% V-8 vegetable juice 與 0.02% $CaCO_3$ 混合後，加入 2% Bacto agar 後滅菌）純化培養 5-7 天（室溫）。分離出之腐霉菌經單厚膜孢子（chlamydospore）分離後，再移置於 5% VA 上，在 24℃下無光照培養 3-5 天，切取前端菌絲塊（10×5×5 mm^3），保存於含無菌水之試管中[3]，置於 20-24℃下，供下列各項試驗使用。分離到的其他種菌類亦經純化保存，供其他試驗使用。

腐霉菌的形態觀察

菌落形態：將供試菌株 py56、py64（兩菌株均分離自彰化溪州苗圃馬拉巴栗根部）及 py94（分離自雲林土庫編辮場馬拉巴栗根部）於室溫（24-28℃）下培養於含有 5% CVA 與 PDA 的培養皿（直徑 9 cm）中培養 7 天。記錄菌落型態，並照相。

孢囊與厚膜孢子之產生：於 24℃下，先將供試菌株在 5% VA 培養基上培養 3-5 天，再將菌落先端切成 5 × 5 × 3 mm^3 的菌絲塊，移置於含有 20 mL 無菌水的玻璃培養皿（直徑 6 cm, Pyrex, New York, USA）中，再經光照處理後鏡檢有無孢囊（sporangia）與游走子（zoospores）產生，至 3 天為止。此外，在厚膜孢子形成方面，鏡檢生長 7-10 天的 5% VA 培養基上菌絲塊。每菌株測量 50 個厚膜孢子。

配對型的測定與卵孢子的產生

配對型(mating type）測定：供試菌株在 5% VA 上培養 3-5 天後，將菌落前端部份切成 2 × 2 × 2 mm^3 小塊，移入含有 10% VA 之小培養皿（直徑 6 cm）的中央，每皿放置菌絲塊 3-4 塊，在 24℃無光照環境下培養 7-10 天，再在顯微鏡下鏡檢有無卵孢子（oospores）產生。如果單一菌株不會形成卵孢子，再將供試菌株分別與標準菌株（*P. splendens*）p416（＋）和 p106（－）（國立中興大學植物病理學系柯文雄教授提供）對峙培養，測定供試菌株的配對型。培養時，兩者移置於 10% VA 培養基上，相距 1 cm，在 24℃無光照環境下培養 7-10 天後，在顯微下觀察，可與 p416（＋）配對產生卵孢子者為“－”型；可與 p106（－）配對形成卵孢子者為“＋” 型。

菌絲生長與溫度之關係

供試菌株先在 5% VA 培養 3-5 天，將菌落先端的部份切成 2 × 2 × 2 mm^3 小塊，移入含 5% CVA 培養皿（直徑 9 cm，每皿含有 20 mL 培養基）的一端（約距邊緣 1 cm）。供試溫度分成 8、12、16、20、24、28、32、33、34、35、36、37℃等 12 處理，並自第二天開始每日測量菌絲的直線生長速率，至菌絲長滿培養皿或生長至第 7 天為止。每處理 3 皿，試驗重複一次。

病原性測定

供試菌株：包括 *P. splendens* py56、py64、py94、py95 及 py96（其中 py56、py64 及 py96 分離自彰化溪州馬拉巴栗苗圃幼苗根部，而 py94、py95 分離自雲林土庫編辮苗根部），共五菌株。

厚膜孢子接種源製備：將生長 3-5 天之供試菌株的菌落切成 5 × 5 × 3 mm^3 的菌絲塊，置於培養皿內，每皿 4-6 塊，再倒入 5% V-8 蔬菜汁（5% V-8 vegetable juice + 0.02% $CaCO_3$）約 20 mL，放置於 24℃定溫箱內，約 5-7 天後將厚膜孢子連同菌絲刮下，加入 100-200 mL 無菌水，利用均質機（Sorvall Omni mixer homogenizer, International）以中速（4500 rpm, 1 min）打碎，使厚膜孢子與菌絲分離，再經 2-3 層無菌紗布過濾，可得純化的孢子懸浮液。將厚膜胞子懸浮液調整濃度為 10^4 spores/mL，作為接種源。

供試植物：供試接種植物包括自行播種萌芽六個月的馬拉巴栗幼苗，苗木移植於含有滅菌土的塑膠盆中（直徑 9 cm，高 12 cm），每盆兩株苗，培養於溫室內，溫室溫度約 25-30℃。

接種方法與病害調查：採用浸根接種方法，將幼苗根部的土壤輕輕去除後洗淨，浸於含有 200 mL 厚膜孢子懸浮液的 500 mL 玻璃燒杯中，浸泡 30 min 後取出，種植於含滅菌土之盆缽中，每盆一株，置於溫室內，逐日觀察病害發生情形，至 28 日為止。每供試菌株接種 5 株幼苗，試驗亦重複一次。所有的對照處理均接種蒸餾水。接種植株發病後，將罹病根部組織切下，以 0.5% NaClO 溶液表面消毒後放置於 5% CVA 半選擇性培養基[9]上分離病原菌，以確定馬拉巴栗植株發病是否為接種菌株所引起，以完成柯霍氏法則（Koch's postulates）。此外，為瞭解腐霉菌感染馬拉巴栗是否需要傷口，進行盆苗莖基部組織接種，分為傷痍與無傷痍處理，傷痍處理者，以 2 號昆蟲針 10 支為一束，輕刺莖基部組織，並以滅菌棉花纏繞莖基部後，接種厚膜孢子懸浮液 5 mL；無傷痍處理者為對照處理。兩者均置於溫室內 28 天，觀察發病情形。每處理接種 8 株幼苗，實驗重複一次。

溫度對腐霉病害發生的影響

為瞭解不同溫度對腐霉菌（以 py94 菌株為代表）誘

發苗木根腐病之影響，將生長 6 個月大的馬拉巴栗幼苗自土壤中移出，以自來水將根部清洗乾淨後，以整枝剪將根部長度 10 cm 以上的尖端剪除，浸泡於厚膜孢子懸浮（10^4 spores/mL）液中 16 小時，隨後置於保鮮盒內保濕後密封，分別置於 8℃、12℃、16℃、20℃、24℃、28℃、32℃及 36℃定溫箱中（12 h light/12 h darkness），每處理溫度接種 9 株。分別於 7 天及 28 天觀察記錄發病情形，並調查罹病度（disease severity）。調查方式將罹病等級數分為 0-4 級；0 級：未出現病徵；1 級：病徵拓展長度小於 1 cm；2 級：病徵拓展長度介於 1-2 cm；3 級：病徵拓展長度大於 2 cm；4 級：植株死亡。所得之罹病等級(0-4 級)資料，再換算為罹病度(disease severity, %)。罹病度（%）= Σ Rn Tn/4N×100%（Rn：代表罹病等級數；Tn：代表該罹病等級株數；N：接種株數）。

核醣體內轉錄區間 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 的 DNA 定序

DNA 抽取：供試菌株先於 5% VA 培養 3-5 天，切取 3 × 3 × 2 mm^3 菌絲塊，移植於覆蓋一層玻璃紙（cellophane member）的 5% VA 培養皿內，在 24℃下無光照培養 5-7 天後，將玻璃紙撕起，刮下菌絲，以無菌水沖洗，再經冷凍乾燥，保存於-20℃下備用。將冷凍乾燥的腐霉菌菌絲約 20 mg 置於研缽中，加入液態氮（liquid nitrogen）後磨成粉末。抽取 DNA 時，依照廠商的操作步驟，利用 Genomic DNA Purification Kit（GeneMark Technology Co., Taichung, Taiwan）進行抽取。

PCR 聚合酶連鎖反應與 DNA 定序（sequencing）：委託昕穎生物科技公司（Seeing Bioscience Company, Taipei, Taiwan）進行 PCR 反應與 DNA 定序。以供試菌株之 genomic DNA 為模板（templates），利用通用引子對（the universal primers）ITS5（正向）與 ITS4（反向）[17]進行 PCR 反應，將核醣體內轉錄區間〔ribosomal internal transcribed spacer （ITS） regions〕的 DNA 序列放大，包括 ITS1 與 ITS2 非轉錄（non-coding）區間、5.8S rDNA 基因，及部份 18S rDNA 基因與 28S rDNA 基因序列。將 PCR 反應後的 DNA 產物直接定序，使用的引子對包括 ITS5 與 ITS4。

DNA 序列的組合（assembly）與 GenBank 資料庫搜尋：利用 Vector NTI 軟體（Vector NTI software v. 10.0，InforMax, California, USA）工具，將上述獲得的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區間 DNA 序列，分別經由組合（contingent）與修剪（trimming）後獲得完整序列，而多型部位(polymorphic portions)則依照 IUPAC ambiguity codes 予以標示。定序後的腐霉菌 DNA 序列則直接利用 NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）網站，經由 BLAST 軟體從 GenBank Database 資料庫中比對尋找最相近的腐霉菌種（species）與菌株。此外，並將具代表性的腐霉菌菌株之 DNA 序列登錄在 GenBank 資料庫中。

腐霉菌之鑑定

依據供試菌株之形態特性，包括孢囊形成與否、厚膜孢子形成與否與大小、配對型與卵孢子、溫度對菌絲生長的影響等特性，再依腐霉菌之分類文獻[12,14,15]，予以傳統分類鑑定。同時比對 ITS 區間 DNA 序列，尋找最相近的腐霉菌種與菌株。

結　果

馬拉巴栗腐霉菌病害的田間、編辮場、集貨場病害調查

依據田間調查結果，腐霉菌（*Pythium sp.*）引起之馬拉巴栗病害在潮濕多雨季節發病嚴重。腐霉菌經常感染編辮場的編辮苗(簡稱編苗) 與集貨場的貨品，造成編苗腐敗，導致苗木失編，及貨品不能外銷與退貨，嚴重時發病率平均可達 30-50%，甚而更高，但不一定侷限於白露期間（9 月前後）（表 1）。染病的編苗其根部或莖基

表 1. 2011 年至 2013 年由不同編辮場與集貨場採集馬拉巴栗罹病株分離 *Pythium splendens* 的情形。

Table 1. Isolation of *Pythium splendens* from diseased Malabar chestnut seedlings at different braiding or packaging houses from 2011 to 2013

Sampling location	Date of sampling	No. colonized with *P. splendens*/ No. diseased plants surveyed	Isolation rate (%)
Tuku, Yunlin	Aug. 2011	0/12	0
	Sep. 2011	0/53	0
	Jan. 2012	22/24	91.7
	Mar. 2012	3/6	50.0
	Non. 2012	24/80	30.0
	Feb. 2013	31/31	100
	Mar. 2013	2/3	66.7
	Aug. 2013	2/40	5.0
	Nov. 2013	9/24	37.5
	Oct.2013	5/44	11.4
Sub total		97/317	30.6
Chichou, Changhwa	Jul. 2012	13/20	65.0
	Non. 2012	0/24	0
	Sep. 2013	9/37	24.3
	Nov. 2013	20/36	31.3
Sub total		42/117	55.6
Total		139/434	33.6

部腐敗，組織軟化，甚而凹陷，切開患部，罹病組織呈水浸狀褐變腐敗（圖 1A）。在潮濕情況下，罹病組織上長出白色霉狀菌絲。在集貨場時，病菌造成根部與莖基部傷口腐敗，氣候潮濕時，罹病部位亦長出白色霉狀物（圖 1B & 1C）。此外，該菌亦可為害馬拉巴栗苗圃的幼苗，在發病初期，染病植株地上部病徵不明顯，嚴重時則下位葉黃化落葉繼而死亡，此時將罹病植株拔起，地下部主根已經凹陷、縊縮，而縊縮部分偶爾會延伸出地表面，切開罹病組織，均已褐化腐敗（圖 1D）。

2011-2013 年共調查 36 處栽培田、17 次編辮場及 23 次集貨場，目前自 26 個場地（檢測率 34.2%）〔包括 10 處田區（苗圃）、編辮場 9 次及集貨場 7 次〕檢測得腐霉菌，共分離得腐霉菌 26 株。

腐霉菌的形態與生長特性

以供試菌株 py56、py64 及 py94 為代表描述馬拉巴栗腐霉菌的形態特性。三菌株於室溫（24-28℃）下培養於含有 5% CVA 與 PDA 的培養皿（直徑 9 cm）中，約培養 3-4 天即可長滿整個培養皿（圖 2A），生長非常快速，在兩種培養基上生長時，無任何花紋，但氣中菌絲極多，佈滿整個培養皿。該菌在固態培養基生長時，或將含菌絲之固態培養基移入水中，均無孢囊形成，但會形成大量球形的厚膜孢子，尤其在無光照的環境下，生長的厚膜孢子更多。厚膜孢子為頂生（terminal）或間生（intercalary）（圖 2B、2C）。供試菌株 py56 與 py94 的

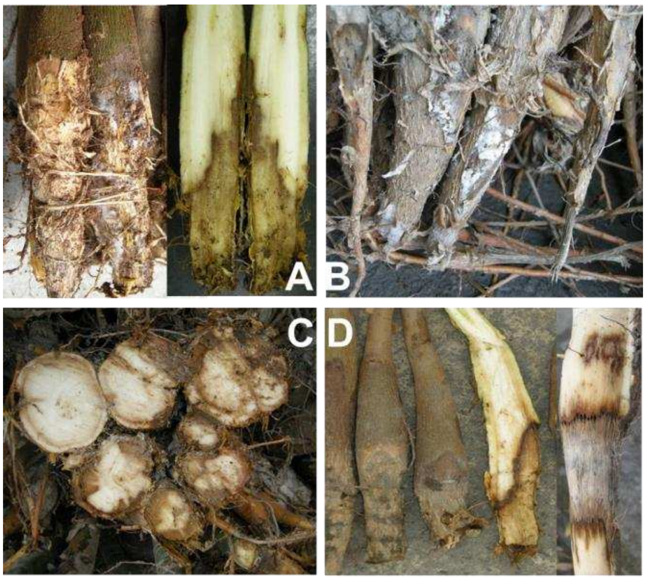

圖 1. ***Pythium splendens*** **引起之馬拉巴栗病害病徵。編辮苗根腐 (A)；出口貨品根腐 (B & C)；田間幼苗根腐 (D)。**

Fig. 1. Symptoms of Malabar chestnut caused by *Pythium splendens*. Serious root rot with white mold on braided seedlings (A) and commodities (B & C); roots rot of seedlings from nursery (D).

厚膜孢子大小分別為 35.0-(39.0)-45.0 μm 與 26.8-(36.5)-48.1 μm。

所有分離之 26 株腐霉菌株在單獨培養時均不會形成卵孢子，屬於異絲型（heterothallism）。但供試菌株 py64、py94、py95、py96、py98、py99、py100 及 py134 與 *Pythium splendens* p416（＋）對峙培養後均會產生卵孢子，而與 *P. splendens* p106（－）對峙培養後則不會產生卵孢子，因此該 8 菌株均為“－”配對型；僅有一株 py56 與 p106(－)對峙培養後會產生卵孢子，而與 p416(＋)對峙培養後不會產生卵孢子，因此該菌株為“＋”配對型。將 py56（＋）與其他馬拉巴栗“－”菌株配對均可形成的有性器官（圖 2D、2E），其藏卵器（oogonia）表面平滑，卵孢子（oospores）非充實性（aplerotic），每一個藏卵器有 1-3 個藏精器（antherdia）附著。py56（＋）與 py94（－）配對形成有性器官藏卵器、卵孢子及藏精器大小分別為 27.5-(31.1)-35.0 μm、25.0-(27.4)-30.0 μm 及 10.0-(12.5)-17.5x12.5-(14.3)-20.0μm。

該腐霉菌菌絲最低生長溫度為 8-12℃，最高生長溫度為 35-36℃，最適生長溫度為 28-32℃。以 py94 為例，最低生長溫度為 8℃，最高生長溫度為 36℃，最適生長溫度為 28℃，在最適生長溫度時，每日平均直線生長速率為 3.2 cm（圖 3）。

馬拉巴栗腐霉菌 Pythium 之鑑定

依據 Waterhouse[14]，Waterhouse & Waterston[16]及 Ven der Plaats-Niterink[12]對 *Pythium* spp.的描述，本研究結果顯示自馬拉巴栗分離得到的腐霉菌，在厚膜孢子大小、有性生殖器官型態與大小，及溫度對菌絲生長的影響等特性方面，應為 *Pythium splendens* Braun。

核醣體內轉錄區間 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 的 DNA 定序

分析從台灣馬拉巴栗分離得到的 6 個 *P. splendens* 菌株（包括 py56、py64、py94、py95、py96、py99，其中 py 56 配對型為“＋”，其餘 5 個菌株為“－”）；進行 ITS1-5.8S rDNA-ITS2（簡稱 ITS）區間 DNA 之定序與比對。py 56（＋）的 ITS 全長序列均為 807 bp，其餘 5 個“－”菌株的全長序列為 806 bp，所有菌株序列的相似度為 99.13-100%，主要在於 py 56（＋）菌株與“－”菌株有 7 個鹽基的不同。利用 NCBI（National Center for Biotechnology Information）網站的 BLAST（Basic Local Alignment Search Tool）搜尋軟體，將 py 56（＋）（Accession no. KM978214）與 py94（－）（Accession no. KM978215）的基因序列上傳與 GenBank 資訊庫收錄的 DNA 序列進行比對，所獲得最接近的序列為 *P. splendens* PPRI8621（Accession no. FJ415950.1）菌株，py 56（＋）與該菌株 ITS 序列的相似度為 99.13%；而 py94（－）與該菌株 ITS 序列的相似度為 99.88-100%。

本試驗結果顯示 *P. splendens* DNA 序列的比對結果與形態鑑定結果具一致性。

腐霉菌之病原性測定

接種試驗結果顯示，5 株供試腐霉菌菌株均不會侵入馬拉巴栗健康苗木組織，但可由傷口入侵。以昆蟲針輕刺 6 個月大的馬拉巴栗幼苗莖基部，再接種腐霉菌厚膜孢子懸浮液，所有供試菌株均會誘發病害，且以 py94 致病力（virulence）最強，接種 7 天後接種部位出現水浸狀病斑，但無傷痍處理者則無發病。此外，將 6 個月大的馬拉巴栗幼苗根系浸泡於厚膜孢子懸浮液中，接種 7-10 天後，接種 py94 菌株之幼苗首先出現葉片黃化掉落情形，繼而發病嚴重者全株落葉後死亡，且出現外觀病徵者，其根部均有軟化腐敗的現象。經病菌分離，皆能回分出接種之 *P. splendens*，完成柯霍氏法則。

人工接種試驗顯示，*P. splendens* py94 菌株接種馬拉巴栗幼苗在 8-32℃均會發病（圖 4），最適合的發病溫度為 24-28℃，在接種 7 天時，罹病度已達 63.9%；在接種

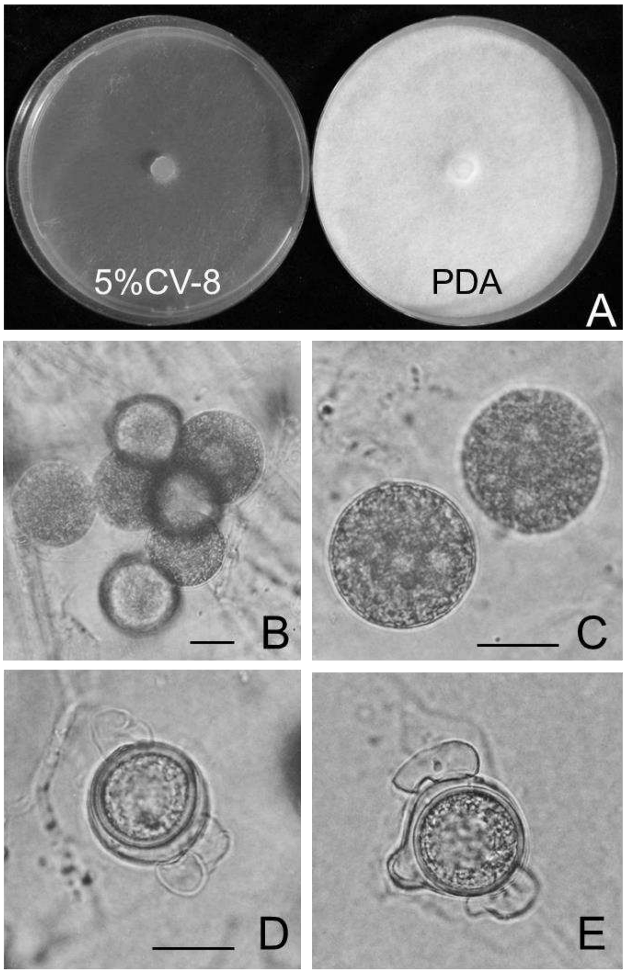

圖 2. *Pythium splendens* 的型態特性。菌株 py94 於 24℃下在 5% CVA 與 PDA 上生長 7 天的菌落形態 (A)；厚膜孢子 (B & C)；菌株 py56(+)與 py94(-)配對形成之有性器官 (D & E)。Bar = 20 μm.

Fig. 2. Characteristics of colony and morphology of *Pythium splendens* from Malabar chestnut. Colony morphology of isolate Py 94 cultured on 5% clarified V-8 juice agar (left plate) or PDA (right plate) at 24℃ for 7 days (A); chlamydospores (B & C); and sexual structures formed by mating of py56(+) and py94(-) in darkness at 24℃ for 14 days (D & E). Bar = 20 μm.

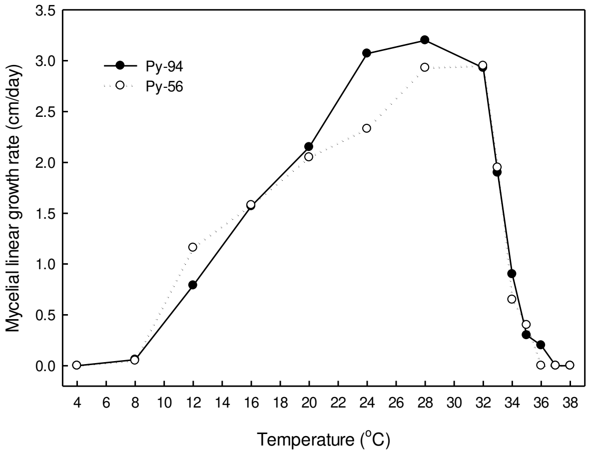

圖 3. 馬拉巴栗腐霉菌 *Pythium splendens* py56 與 py94 菌株在不同溫度下之直線生長情形。

Fig. 3. Effect of temperature on the mycelial linear growth of *Pythium splendens* isolates Py-56 and Py-94 isolated from Malabar chestnut. Cultures were grown on 5% clarified V-8 juice agar in Petri dishes for 7 days.

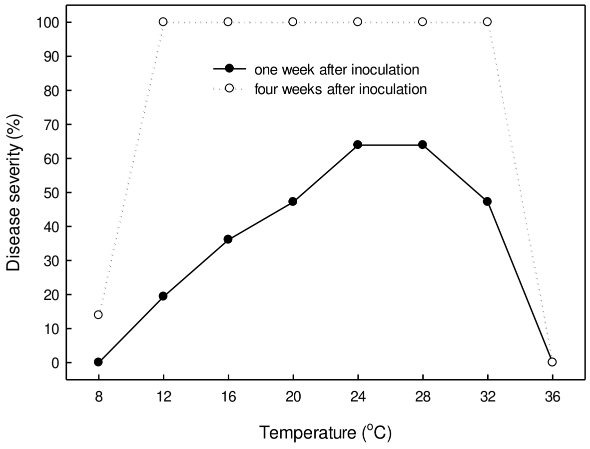

圖 4. 不同溫度對腐霉菌 *Pythium splendens* Py-94 菌株誘發馬拉巴栗根腐病之影響。.

Fig. 4. Effect of temperature on disease severity of seedling root rot of Malabar chestnut inoculated with chlamydospore suspension of *Pythium splendens* py94.

28天時，罹病度達100%。其次適合發病的溫度為20℃與32℃，接種7天時，罹病度47.2%；在接種28天時，罹病度亦達100%。而溫度過低或過高時，罹病度很低，甚而不發病，當溫度在8℃時，7天的罹病度為0，28天時的罹病度為13.9 %；而溫度在36℃時，植株並未發病。

討　論

Pythium splendens 在世界的分佈十分廣泛，普遍存在溫暖的溫帶與亞熱帶地區[16]，寄主種類繁多，依據美國農部農業研究服務網站（Agriculture Research Services）"Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory"（http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/index.cfm）的記載[7]，*P. splendens* 的寄主包括 248 種植物，涵括多種果樹、蔬菜、花卉及林木，主要造成植物腐敗（blight），幼苗猝倒（damping-off），根、種子及冠腐（root, seed, and crown rots）。在台灣，該菌的研究甚少，登錄在植物病害名彙的寄主作物僅有 23 種[8]，引起的病害主要為幼苗猝倒病（damping-off）、基腐病（basal stem rot）、腐敗病（blight）及根腐病（root rot）等，且對病菌與病害未做過詳盡的描述。

Pythium splendens 是一種很獨特的腐霉菌，與絕大部分腐霉菌相異，它不會形成會釋放游走子的游走孢子囊（zoosporangia），而替代長出大量具有暗褐色球狀的器官[16]，不同學者給予它不同的名稱，包括 chlamydospores[16]、conidia[14,15]或 hyphal swellings[12]，本文稱其為厚膜孢子（chlamydospores）。本試驗亦證實該器官可以發芽，並可成為感染源，侵染寄主受傷根系，具有厚膜孢子的功能。此外，該菌為異絲型，單獨培養不會形成有性世代，產生卵孢子。本試驗從馬拉巴栗分離的 *P. splendens*，無論在厚膜孢子的型態與大小、卵孢子型態與大小，或是溫度對病菌的生長的影響方面均與 Waterhouse & Waterston[16]對該菌的描述十分相似。在分子特性方面，台灣馬拉巴栗菌株的 ITS DNA 序列亦與 NCBI 網站 GenBank 資訊庫收錄的 *P. splendens* 序列具有高達 99.13-100%的相似度，印證傳統鑑定的可信度，顯示台灣馬拉巴栗腐霉菌為典型的（typical）*P. splendens*。

在台灣，外銷馬拉巴栗苗木的生產過程繁瑣且冗長，病害的發生經常是編苗生產的主要限制因子。經前往苗圃、編辮場、本田及集貨場調查、採集與分離病害標本及進行接種試驗，得知馬拉巴栗苗木的主要病害包括苗木疫病（*Phytophthora* species 引起）[5]、腐霉根腐病（*Pythium splendens* 引起）及編苗黑腐病（*Lasiodiplodia thiobromae* 引起）[11]三種。本文探討的腐霉菌主要為害馬拉巴栗根部與莖基部，無論苗期、編辮時、本田期或採收期均可發生，但以編辮時發病最為嚴重，其次為貨品採收時，尤其是降雨季節濕度高時，可以造成小編苗（高度 30 cm 以下）全批失編；該腐霉菌也是造成出口貨品根部腐敗的主要原因之一。此外它可以為害幼苗，引起幼苗根腐病，但在本田時較少發生，未被分離得到。而其他兩種病原菌，疫病菌主要為害苗圃幼苗全株，造成幼苗大量死亡，也可引起編辮苗與採收貨品的根部與莖基部腐敗，造成苗木失編與貨品無法出口外銷[5]。而 *L. thiobromae* 主要感染編辮時之苗木與採收貨品的根部與莖基部，造成編辮苗失編與貨品腐敗、導致無法外銷甚而退運，嚴重影響我國商譽。實驗結果顯示，*P. splendens*[2]與 *L. theobromae*[11]都是弱病原菌或伺機性病原菌，侵染馬拉巴栗組織時需要傷口，才能侵入感染。由於馬拉巴栗的編辮作業與採收流程，包括挖掘與剪根，都會造成根部與莖基部組織嚴重受傷，才給予兩菌入侵的管道與機會，誘發嚴重的根腐病與莖基腐病。

綜合本研究的結果，得知馬拉巴栗腐霉根腐病的發生並非侷限於白露期間，而是在溫暖潮濕的降雨季節（降雨資料未呈現），當苗木受傷時，潮濕土壤中活躍的 *P. splendens* 病原菌便可由傷口侵入植物組織，誘發病害。因此，預防腐霉根腐病的發生，首先勿在降雨季節播種、拔苗及收穫，該期間發病與傳播機率均較高。其次是選用適當藥劑來保護苗圃幼苗、編苗及採收貨品。藥劑的選擇可以參考防治疫病的藥劑共同使用[6]，將剪根後的編辮苗浸於藥劑中 5-10 min；在集貨場貨品修剪完畢後，亦應噴灑或浸泡藥劑，以保護傷口。本文 *P. splendens* 為害馬拉巴栗為國內外首度報導。

誌　謝

本文承蒙行政院農業委員會科技計畫〔101 農科-14.2.1-檢-B3(3)與 102 農科-14.2.1-檢-B3(3)〕補助試驗經費，及柯文雄教授修改英文，謹此誌謝。

引用文獻

1. Ann, P. J., Su, J. F. Yang, C. W., Hsu, Z. H., Young, C. K., Tsay, H. C., and Chern, L. L. 2012. Seedling braiding disease of Malabar chestnut caused by *Lasiodiplodia theobromae* and management of root rot disease of this crop in the fields. Plant Pathol. Bull. 21: 150-151. (abstract in Chinese)
2. Ann, P. J., Su, J. F., Yang, C. W., Lin, J. P., Tsay, H. C., and Chern, L. L. 2013. Seedling disease of Malabar chestnut caused by *Phytophthora* and *Pythium* and chemical control in greenhouse. Plant Pathol. Bull. 22: 169-170. (abstract in Chinese)
3. Boesewinkel, H. J. 1976. Storage of fungal cultures in water. Trans. Br. Mycol. Soc. 66: 183-185.
4. Chen, J. W., Chern, L. L., Her, S. P., and Chen, L. Y. 2010. Study on stem rot of *Pachira macrocarpa*. Plant Pathol. Bull. 19: 291. (abstract in Chinese)
5. Chern, L. L., Ann, P. J., Su, J. F., Wang, I. T., Yang, C.

W., Tsay, H. C., Tsai, J. N., Lin, J. P. and Hsieh, T. F. 2014a. Seedling blight of Malabar chestnut caused by *Phytophthora* species in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23: 237-247. (in Chinese with English abstract)

6. Chern, L. L., Ann, P. J., Su, J. F., Yang, C.W., Tsay, H. C., Tsai, J. N., and Hsieh, T. F. 2014b. Screening of chemicals for control of seedling blight of Malabar chestnut in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 63: 275-282. (in Chinese with English abstract)
7. Farr, D. F., and Rossman, A. Y. 2014. Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Retrieved October 19, 2014, from http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/
8. Hsu, S. T., Chang, T. T., Chang, C. C., Tsai, J. L. and Tsay, T. T. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan. 4th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
9. Ko, W. H., Chang, H. S., and Su, H. J. 1978. Isolates of *Phytophthora cinnamomi* from Taiwan as evidence for an Asian origin of the species. Trans. Br. Mycol. Soc. 71: 496-499.
10. Shen, R. S. 2005. Malabar chestnut. Page 877-882 *in*: Taiwan Agriculture Encyclopedia: Crop edition-2. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei. (in Chinese)
11. Su, J. F., Ann, P. J., Yang, C. W., Hsu, Z. H., Chern, L. L., Tsay, H. C., Huang, C. C. and Hsieh, T. F. 2014. Black rot of braided seedlings of Malabar chestnut caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23:269-277 (in Chinese with English abstract)
12. Van der Plaats-Niterink, A. J. 1981. Monograph of the Genus *Pythium*. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures. Mycology. No. 21. 242 pp.
13. Wang, T. S. 2010. Handbook of Postharvest Treatment for Malabar Chestnut. Chinese Pot Flower Development Association Pub. Taipei, 32 pp. (in Chinese)
14. Waterhouse, G. M. 1967. Key to *Pythium* Pringsheim. Mycol. Pap.109.15pp.
15. Waterhouse, G. M. 1968. The genus *Pythium* Pringsheim- Diagnoses (or Descriptions) and Figures from the Original Papers. Mycol. Pap. 110. CMI, Kew Surrey, England.
16. Waterhouse, G. M., and Waterston, J. M. 1966. *Pythium splendens*. CMI Description of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 120.
17. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. Page 315-322 in: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. (Innis, M.A., Gelfand, D. H., Snirsky, J. J., and White, T. J., eds) Academic Press. San Diego, USA., 482 pp.

ABSTRACT

Ann, P. J.[1,5], Chern, L. L.[2], Su, J. F.[1], Yang, C. W.[1], Tsai, H. L.[1], Tsay, H. C.[3], Tsai, J. N.[1], and Hsieh, T. F.[4]. 2014. Seedling Diseases of Malabar Chestnut Caused by *Pythium splendens* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23: 285-292. ([1]Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture (COA), Wefeng, Taichung, Taiwan, ROC.; [2] Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.; [3] Animal and Plant Health Inspection and Quarantine Bureau, Taichung Branch, COA; Chiayi, Taiwan, ROC.; [4] Floriculture Research Center, TARI, COA, Yunlin, Taiwan, ROC.; [5] Corresponding author, e-mail: pjann5039@gmail.com; Fax: +886-4-23302803)

Based on the survey in the fields, braiding houses and packaging houses from 2011 to 2013 in Taiwan, a *Pythium* species was found to cause the major diseases of Malabar chestnut (*Pachira macrocarpa*) including braided seedling root rot and commodity root rot. The pathogen infected seedlings through the wounded root systems causing death of part or all of the braided seedlings. During raining season, the disease incidences of braiding seedlings might up to 30-50% or more and caused serious economic loss. *Pythium* species also attacked the underground parts of seedlings resulting in the main root constricted and browning, leaf yellowing and premature falling, and seedling death in the nursery stage. A total of 26 *Pythium* isolates was obtained from 26 locations including nurseries, braiding houses and packaging houses. All isolates were identified as *P. splendens*. The pathogen did not form sporangia in cultures but produced numerous chlamydospores. The mycelium of pathogen could grow at temperature ranging from 8-35℃ with optimum growth at 28℃. The result of inoculation test showed that *P. splendens* was one of the major causal microorganisms causing root rot of braided Malabar chestnut seedlings via wounded treatments. It caused disease at 12-32℃ with optimum temperature at 24-28℃. The root rot disease of Malabar chestnut braided seedling caused by *P. splendens* has not been reported in any other countries prior to this report.

Key words: *Pachira macrocarpa*, Malabar chestnut, braided seedling root rot, *Pythium splendens*.